

***Hibiscus Sabdariffa* Linn) terhadap NF- κ B, TNF- α dan ICAM-1 pada Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Cultured yang dipapar Low Density Lipoprotein (LDL) Teroksidasi**

Dwi Sarbini^{1*}, Djanggan Sargowo², M. Saifur Rohman³

¹Program Studi Biomedik Universitas Brawijaya

²Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

³Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui efek dan mekanisme kerja ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap aktivasi NF- κ B dan ekspresi protein TNF- α serta ICAM-1 yang menjadi mediator inflamasi pada aterosklerosis. Penelitian ini menggunakan kultur sel endotel yang diisolasi dari vena umbilikalis manusia (HUVECs). Kelompok kontrol digunakan HUVECs tanpa paparan ox-LDL (kontrol negatif) dan HUVECs yang dipapar 40 μ gml⁻¹ Ox-LDL (kontrol positif). Kelompok perlakuan adalah HUVECs yang dipapar dengan berbagai dosis teh Rosella merah (0,01 mgml⁻¹, 0,005 mgml⁻¹ dan 0,001 mgml⁻¹) dan diberikan selama 2 jam sebelum dipapar ox-LDL. Pengukuran aktivasi NF- κ B dilakukan setelah 30 menit paparan Ox-LDL menggunakan imunohistokimia. Ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1 diukur setelah 24 jam dipapar Ox-LDL menggunakan imunohistokimia. Berdasarkan analisis ANOVA ($p < 0.01$) terdapat efek penghambatan ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap aktivasi NF- κ B dan ekspresi protein TNF- α serta ICAM-1 yang menjadi mediator terjadinya inflamasi pada aterosklerosis melalui penghambatan aktivasi NF- κ B. Terdapat hubungan negatif antara aktivasi NF- κ B dan ekspresi protein TNF- α serta ICAM-1 dengan dosis ekstrak teh Rosella merah (Analisis Spearman's [$p < 0,01$, Correlation Coeff = -1]).

Kata kunci: atherosklerosis, ICAM-1, NF- κ B, Ox-LDL, Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn), TNF- α

PENDAHULUAN

Penyakit kardiovaskuler menjadi masalah kesehatan di dunia dan di Indonesia. Kardiovaskuler juga merupakan penyebab kematian utama di dunia sampai tahun 2020, termasuk juga penyakit jantung koroner dan pembuntuan pembuluh darah otak yang diantaranya disebabkan oleh aterosklerosis [1]. Aterosklerosis merupakan proses inflamasi atau peradangan kronis yang dihasilkan sel radang. Peradangan ini dipicu oleh modifikasi *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang poten sebagai penyebab aterosklerosis adalah *oxidized LDL* [2].

Oxidized LDL (Ox-LDL) meningkatkan ROS (*Reactive Oxygen Species*). *Oxidized LDL* bersifat sitotoksik dan berfungsi sebagai kemotaksis faktor bagi monosit yang mengakibatkan penumpukan sel-sel radang. Keradangan terjadi karena Ox-LDL mengaktifkan faktor transkripsi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B). NF- κ B yang teraktifasi akan menginduksi terbentuknya

protein-protein sistem imun dan zat perantara yang dapat meningkatkan progresifitas aterosklerosis atau memicu ruptur dari plak aterosklerosis dan mengakibatkan pembuntuan arteri koroner (*infark miokard*), pembuluh darah otak (*stroke*) dan lain-lain [3]. Mengingat peradangan menjadi faktor utama dari patogenesis aterosklerosis maka NF- κ B terlibat dalam patogenesis aterosklerosis dengan merangsang sel radang dan molekul adesi maka pencegahan dan pengobatan aterosklerosis dapat di mulai dengan penghambatan aktivasi protein penting yang menimbulkan proses peradangan, yaitu NF- κ B sebagai target [4].

Upaya pencegahan melalui obat-obatan, diantaranya dengan pemanfaatan tumbuhan daerah tropis. Salah satu tumbuhan tropis yang dapat digunakan sebagai fitofarmaka untuk pencegahan terjadinya aterosklerosis adalah teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn.). Teh rosella merah mempunyai aktifitas antioksidan. Berdasarkan penelitian oleh Chang *et al.*, (2003), di Jepang telah dibuktikan bahwa pemberian ekstrak kering *Hibiscus sabdariffa* L 0,5-1% pada diet dapat menghambat arterosklerosis dengan menurunkan kadar kolesterol, LDL, trigliserid dan menghambat pembentukan *foam cell* serta

* Alamat korespondensi penulis:

Dwi Sarbini

Email : dwi_sarbini@yahoo.com

Alamat : Program Studi Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang, 65145

mencegah migrasi sel otot polos dan kalsifikasi pembuluh darah pada kelinci [5].

Senyawa bioaktif utama yang berperan sebagai antioksidan dalam Rosella merah adalah *protocatechuic acid* (PCA) dan *antocyanin* serta *asam askorbat*. Selain itu, *Hibiscus sabdariffa* Linn dapat menangkap ROS dan radikal bebas, menurunkan O₂ reaktif, metabolisme peroksidasi lemak menjadi produk non radikal, dan mencegah generasi radikal bebas sehingga melindungi jantung dengan netralisasi radikal bebas sampai 44% tetapi mekanisme kerja teh Rosella merah pada penghambatan aterosclerosis belum banyak diketahui.

Melihat patomekanisme aterosclerosis, Ox-LDL merupakan salah satu penyebab utama proses aterosclerosis diantaranya melalui pembentukan *Reactive Oxygen Species (ROS)*, menyebabkan aktivasi NF- κ B. NF- κ B merangsang protein gen antara lain molekul adesi ICAM-1 dan sitokin TNF- α yang dapat memicu perkembangan aterosclerosis sehingga dapat menyebabkan serangan jantung mendadak (*infark miokard*) akibat pembuntuan arteri koroner sebagai komplikasi klinik dari aterosclerosis. Teh Rosella merah diduga mempunyai efek pada jalur ini, tetapi hal ini perlu dibuktikan berikut dosis pemberian teh Rosella Merah. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek dan mekanisme kerja dari ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap penghambatan aktivasi NF- κ B dan penurunan ekspresi protein TNF- α serta ekspresi protein ICAM-1 yang memediasi terjadinya inflamasi pada aterosclerosis.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true eksperimental*) secara *in vitro* dengan menggunakan HUVECs sebagai model.

Pengambilan Umbilikus

Umbilikus diambil melalui persalinan spontan dengan duduk atau melalui persalinan caesar, dengan kriteria inklusi adalah kehamilan fisiologis. Sedangkan eksklusinya adalah kehamilan dengan preeklampsia atau eklampsia, kehamilan dengan infeksi, kehamilan dengan hipertensi dan kehamilan dengan diabetes melitus. Beberapa tahapan yang perlu diperhatikan dalam penelitian adalah pengerjaan kultur sel endotel tidak melebihi 12 jam setelah waktu kelahiran. Disiapkan botol berisi *cord solution* dari refrigerator (suhu 4 °C), umbilikus dipotong

sepanjang \pm 20 cm kemudian dimasukkan larutan *cord solution* segera setelah kelahiran.

Isolasi dan Pembuatan Kultur Sel Endotel (HUVECs)

Umbilikus dicuci PBS yang bebas kalsium sampai bersih. Selanjutnya dilakukan isolasi enzim kolagenase 6-7 menit pada 37 °C dan dicuci dengan PBSa. Disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 8 menit. Supernatan atau bagian atas dibuang, *presipitant* (endapan) yang terbentuk merupakan sel endotel dan ditambahkan medium 20% NBS. Kemudian didispersi dan ditanam dalam *plate*. Dilakukan inkubasi selama 30 menit. Dicuci medium dasar. Ditambahkan medium kultur (RPMI+NBS 20%). Dinkubasi selama 3-4 hari sampai kultur sel endotel *confluent* dan monolayer

Pemberian Ekstrak Teh Rosella Merah Merujuk Lopez (2003) [6]

Kultur primer sel endotel yang telah monolayer diinkubasi dengan atau tanpa ekstrak teh Rosella merah selama 2 jam (dosis 0,01 mgml⁻¹, 0,005 mgml⁻¹ dan 0,001 mgml⁻¹), kemudian ditambahkan Ox-LDL 40 μ gml⁻¹, selama 30 menit. Kemudian langsung diamati pengaruhnya terhadap aktivasi NF- κ B. Setelah 24 jam diamati peningkatan ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1.

Ekstraksi Teh Rosella Merah

Teh Rosella merah dihaluskan dan ditimbang sebanyak 250 gram dimasukkan corong pisah yang telah diberi kertas saring pada ujungnya. Ditambahkan etanol absolut 2 liter (1:4). Diagitasi selama 4-6 jam selanjutnya didiamkan selama semalam sampai \pm daya tampung 1 labu (\pm 12 jam). Diambil fraksi terlarut. Diulangi kembali untuk agitasi dan inkubasi semalam sampai larutan jernih. Diambil fraksi terlarut dan hasil ekstraksi dievaporasi.

Pemeriksaan aktivasi NF- κ B, ekspresi TNF- α dan ICAM-1 merujuk pada Calara (2000) [7] secara imunohistokimia

Biakan sel dicuci dengan PBS selama 30 menit dan difiksasi dengan methanol selama 5 menit. Biakan sel dikeringanginkan dan cuci dengan PBS pH 7,4. Diaplikasikan 3% H₂O₂ selama 10 menit dan dicuci dengan PBS pH 7,4. Dilakukan *blocking* dengan serum 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100 dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Biakan sel dicuci dengan PBS pH 7,4 dan ditetesi dengan *monoclonal anti p50/p65*, anti TNF- α dan ICAM-1 dan diinkubasi semalam. Sel dicuci dengan PBS pH 7,4 kemudian ditetesi dengan antibodi sekunder berlabel biotin dan

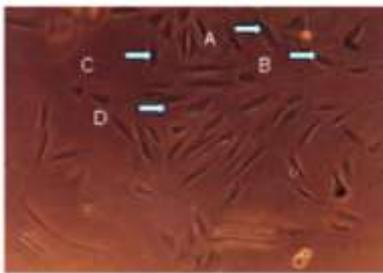
diinkubasi selama 1 jam. Dicuci dengan PBS pH 7,4 dan ditetesi SA-HRP (*Strep-Avidin Horse Radish Peroxidase*) selama 40 menit, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 dan ditetesi substrat *cromogen* untuk HRP, yaitu DAB (Diamono Benzidine). *Counterstain* dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit, dibilas dengan air mengalir dan dicuci dengan dH₂O. Preparat dikeringkan dan ditutup *coverglass*.

Analisis Data

Untuk mengetahui adanya pengaruh bermakna pada berbagai perlakuan maka dilakukan analisis statistik menggunakan *Anova*. Untuk mengetahui perbedaan nyata antar perlakuan dilanjutkan uji Duncan ($p < 0,01$). Hubungan antar perlakuan diketahui melalui uji korelasi non parametrik Spearman's ($p < 0,01$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Dan Kultur Sel Endotel Vena Umbilikalis Manusia (HUVECs)



Gambar 1. Morfologi sel endotel vena umbilikalis manusia primer normal hari ke-4 kultur, diambil dengan mikroskop inverted merk nikkon dengan perbesaran 400x.

Keterangan :

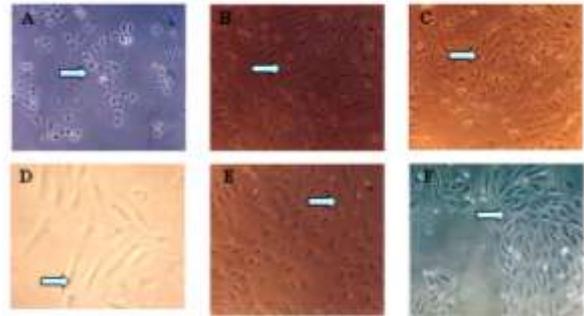
A. Inti sel; B. Sitoplasma; C. Membran plasma; D. Matrik Ekstra Seluler (ECM)

Morfologi sel endotel vena umbilikalis manusia primer normal pada hari ke-4 kultur tampak normal (Gambar 1). Menurut Arjita *et al.*, (2002), ciri-ciri sel endotel normal secara morfologis adalah bentuk sel endotel *cobblestone* dengan ciri spesifik sel pada bagian tengah tampak bulat dan terang (menyala), bentuk sel pipih dengan jarak antara sel teratur dan rapat, permukaan sel halus ditandai dengan penampakan inti, membran plasma, sitoplasma, *extra cellular matriks* (ECM) dan tidak terdapat sel yang apoptosis serta monolayer primer [8].

Optimalisasi Dosis Ekstrak Teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn)

Berdasarkan hasil pengamatan pada sel endotel yang diinkubasi dengan ekstrak teh Rosella merah berbagai dosis, diketahui terjadi respon yang berbeda terhadap masing-masing

dosis perlakuan. Sel endotel mengalami kematian 2 jam setelah perlakuan teh Rosella dosis tinggi (0,2 mgml⁻¹; 0,1 mgml⁻¹; dan 0,5 mgml⁻¹). Sel endotel yang diinkubasi dengan ekstrak Sedangkan inkubasi sel endotel dengan ekstrak teh dosis 0,01 mgml⁻¹, 0,005 mgml⁻¹ dan 0,001 mgml⁻¹ terlihat sel hidup (Gambar 2).



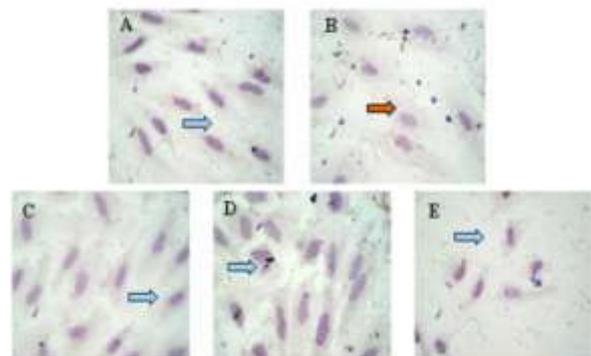
Gambar 2. Sel Endotel Vena Umbilikalis Manusia Primer Normal Hari Ke-4 kultur, setelah dipapar dengan ekstrak Teh Rosella Merah Selama 2 Jam, diambil dengan mikroskop inverted merk nikkon dengan perbesaran 400x.

Keterangan :

A. 0,2 mgml⁻¹, semua sel mati; B. 0,1 mgml⁻¹, sebagian besar sel *shrinkage* dan *floating*; C. 0,05 mgml⁻¹, semua sel *shrinkage*; D. 0,01 mgml⁻¹, semua sel hidup; E. 0,005 mgml⁻¹, semua sel hidup; F. 0,001 mgml⁻¹, semua sel hidup

Pengukuran Aktifasi NF- κ B secara Imunohistokimia

Hasil hasil pengecatan imunohistokimia untuk aktifasi NF- κ B pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil sediaan sel endotel dengan pengecatan imunohistokimia untuk melihat aktifasi NF- κ B, diambil dengan mikroskop Olympus cx21 dengan perbesaran 1000x.

Keterangan :

A. Sel Endotel normal (kontrol negatif), tidak terdapat aktifasi NF- κ B dengan inti sel biru terang
B. Sel endotel yang dipapar Ox-LDL 40 μ gml⁻¹ (kontrol positif), NF- κ B banyak teraktifasi dengan inti sel lebih pucat dan tipis

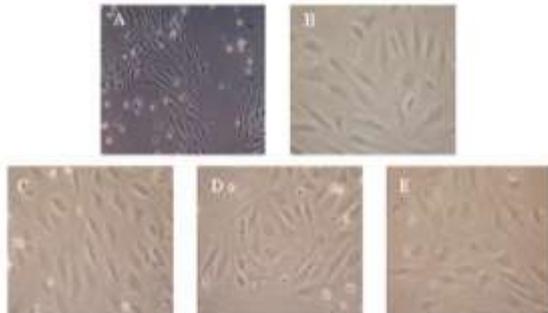
- C. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis mgml⁻¹, terjadi penurunan aktivasi NF- κ B dengan inti sel lebih biru
- D. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0,005 mgml⁻¹, terjadi penurunan aktivasi NF- κ B lebih banyak dengan inti sel lebih biru terang
- E. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0,01 mgml⁻¹, tidak terjadi NF- κ B dengan inti sel lebih biru dan terang. Panah biru = positif aktivasi NF- κ B, panah merah = negatif aktivasi NF- κ B.

Pada penghitungan aktivasi NF- κ B, pemberian ox-LDL meningkatkan aktivasi NF- κ B. Hasil perhitungannya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Efek pemberian ekstrak teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa Linn*) terhadap aktivasi NF- κ B

No	Kelompok Perlakuan	Jumlah Sel	Aktivasi NF- κ B ((\bar{X} ±SD)%)
1.	Kontrol negatif	251	2.21 ± 7.28 ^a
2.	Kontrol positif	175	48.40 ± 17.84 ^b
3.	TM1 (0,001 mgml ⁻¹)	166	1.70 ± 4.2 ^a
4.	TM2 (0,005 mgml ⁻¹)	402	0.73 ± 2.39 ^a
5.	TM3 (0,01 mgml ⁻¹)	533	0.00 ± 0.00 ^a

Keterangan: Data adalah rerata ± SD. Berdasarkan analisis statistik Duncan (p<0.01), perbedaan notasi huruf menunjukkan terdapat perbedaan nyata.



Gambar 6. Sel endotel vena umbilikalis manusia setelah dipapar ekstrak teh merah selama 2 jam dan dipapar ldl teroksidasi selama 24 jam sebelum dilakukan pengecatan imunohistokimia, diambil dengan mikroskop inverted merk nikon dengan perbesaran 400x.

Keterangan: Semua sel dalam keadaan hidup. A. Sel Endotel normal (kontrol negatif) ; B.Sel endotel yang dipapar Ox-LDL 40 µgml⁻¹ (kontrol positif); C. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.001 mgml⁻¹; D. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.005 mgml⁻¹; E. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.01 mgml⁻¹.

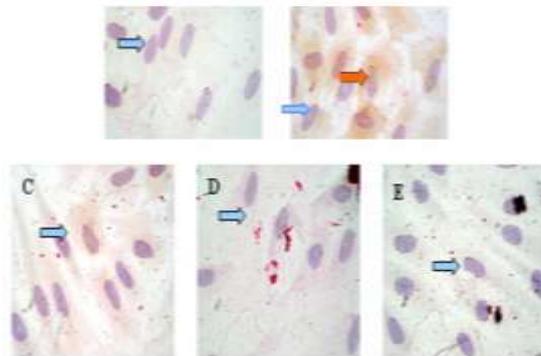
Optimalisasi Kadar LDL Teroksidasi (Ox-LDL)

Berdasarkan hasil pengukuran aktivasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α dan ekspresi protein ICAM-1 pada berbagai perlakuan dengan kadar Ox-LDL 50 µgml⁻¹ dan 40 µgml⁻¹ secara lengkap dapat diketahui bahwa kadar LDL teroksidasi (Ox-

LDL) 50 µgml⁻¹ bersifat toksik bagi sel endotel ditandai dengan kematian sel endotel yang sebelumnya diinkubasi dengan ekstrak teh dosis tertinggi (0,01 mgml⁻¹) sedangkan pada kadar 40 µgml⁻¹ sel nampak hidup sehingga untuk melihat efek pemberian ekstrak teh Rosella merah terhadap aktivasi NF- κ B dan ekspresi protein TNF- α serta ICAM-1 digunakan kadar Ox-LDL 40 µgml⁻¹.

Pengukuran Ekspresi Protein TNF- α Secara Imunohistokimia

Hasil kultur sel endotel Vena Umbilikalis Manusia (HUVECs) yang telah dipapar ekstrak teh rosella merah selama 2 (dua) jam dan selanjutnya dipapar Ox-LDL selama 24 menit ditunjukkan pada Gambar 6. dan hasil pengecatan secara imunohistokimia pada Gambar 7.



Gambar 7. Hasil Sediaan Sel endotel dengan Pengecatan Imunohistokimia untuk melihat Ekspresi Protein TNF- α , diambil dengan mikroskop Olympus cx21 dengan perbesaran 1000x.

Keterangan : A. Sel Endotel normal (kontrol negatif), tidak terdapat ekspresi protein TNF- α ditandai warna inti sel biru; B.Sel endotel yang dipapar Ox-LDL 40 µgml⁻¹ (kontrol positif), banyak terdapat ekspresi protein TNF- α dengan inti sel berwarna kecoklatan bagian sitoplasma berwarna merah; C. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.001 mgml⁻¹, terjadi penurunan ekspresi protein TNF- α dengan sebagian besar inti sel warna biru ; D. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.005 mgml⁻¹, ekspresi protein TNF- α berkurang lebih banyak dengan inti sel banyak berwarna biru ; E. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.01 mgml⁻¹, ekspresi protein TNF- α semakin berkurang dengan lebih banyak inti sel banyak berwarna biru. Panah biru = positif TNF- α , panah merah = negatif TNF- α .

Berdasarkan hasil pengukuran ekspresi protein TNF- α menunjukkan bahwa pemberian LDL teroksidasi (Ox-LDL) pada kelompok kontrol positif (40,28 ± 16,81) meningkatkan jumlah ekspresi protein TNF- α 100 kali lipat dibanding kelompok normal (0,00 ± 0,00). Jumlah protein TNF- α yang terekspresi pada kelompok perlakuan

yang diberikan ekstrak teh rosella Merah dengan berbagai dosis yaitu 0,001 mgml⁻¹, 0,005 mgml⁻¹ dan 0,01 mgml⁻¹ menurun secara bermakna (p<0,01) berturut-turut 36,23%, 38,19%, 38,61% dibanding pada kelompok yang tidak diberikan ekstrak teh rosella merah (kontrol positif) yang dapat dilihat pada Tabel 2. Peningkatan ekspresi protein TNF- α , tertinggi ditunjukkan kelompok kontrol positif (sel yang dipapar dengan ox-LDL) dan ekspresi terendah pada kelompok yang diberikan ekstrak teh rosella merah dosis terbesar yaitu 0,01 mgml⁻¹.

Hasil analisis statistik korelasi non parametrik menggunakan Spearman's (p<0,01) didapatkan bahwa terdapat hubungan negatif antara jumlah ekspresi protein TNF- α pada kelompok kontrol positif dengan jumlah ekspresi protein TNF- α pada kelompok yang diberikan ekstrak teh dengan berbagai dosis dengan koefisien korelasi -1. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar pemberian dosis ekstrak teh pada sel endotel yang telah dipapar Ox-LDL semakin kecil jumlah ekspresi protein TNF- α .

Tabel 2. Efek pemberian ekstrak teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap ekspresi protein TNF- α

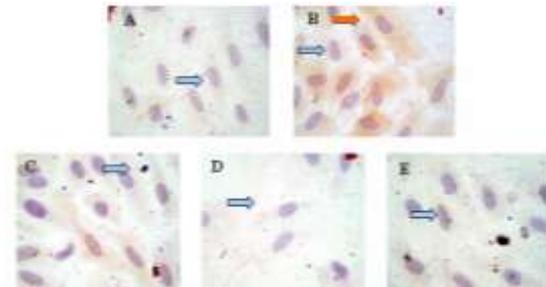
No	Kelompok Perlakuan	Jumlah Sel	Ekspresi Protein TNF- α (X \pm SD)%
1.	Kontrol negatif	147	0.00 \pm 0.00 ^a
2.	Kontrol positif	267	40.28 \pm 16.81 ^b
3.	TM1 (0.001 mgml ⁻¹)	220	4.05 \pm 8.72 ^a
4.	TM2 (0.005 mgml ⁻¹)	267	2.09 \pm 6.56 ^a
5.	TM3 (0.01 mgml ⁻¹)	239	1.67 \pm 7.45 ^a

Keterangan: Data adalah rerata \pm SD. Berdasarkan analisis statistik Duncan (p<0.01), perbedaan notasi huruf menunjukkan terdapat perbedaan nyata.

Pengukuran Ekspresi Protein ICAM-1 Secara Imunohistokimia

Berdasarkan hasil pengukuran ekspresi protein ICAM-1 menunjukkan bahwa pemberian LDL teroksidasi (Ox-LDL) pada kelompok kontrol positif (96,17 \pm 12,39) meningkatkan jumlah ekspresi protein ICAM-1 100 kali lipat dibanding kelompok normal (0,00 \pm 0,00). Jumlah protein ICAM-1 yang terekspresi pada kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak teh rosella merah dengan berbagai dosis yaitu 0,001 mgml⁻¹, 0,005 mgml⁻¹ dan 0,01 mgml⁻¹ menurun secara bermakna (p<0.01) berturut-turut 71,68%, 94,2%, 95,46% dibanding pada kelompok yang tidak diberikan ekstrak teh rosella merah (kontrol positif) yang ditunjukkan pada Tabel 3. Ekspresi protein ICAM-1 tertinggi pada kelompok kontrol positif dan terendah pada kelompok yang

diberikan ekstrak teh rosella merah dosis terbesar yaitu 0,01 mgml⁻¹.



Gambar 9. Hasil Sediaan Sel endotel dengan Pengecatan Imunohistokimia untuk melihat Ekspresi Protein ICAM-1, diambil dengan mikroskop Olympus CX21 dengan perbesaran 1000x.

Keterangan : A. Sel Endotel normal (kontrol negatif) , tidak terdapat ekspresi protein ICAM-1 ditandai warna inti sel biru, permukaan membran tidak berwarna kecoklatan; B.Sel endotel yang dipapar Ox-LDL 40 μ gml⁻¹ (kontrol positif), banyak terdapat ekspresi protein ICAM-1 dengan inti sel berwarna kecoklatan bagian permukaan membran berwarna coklat; C. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0,001 mgml⁻¹, terjadi penurunan ekspresi protein ICAM-1 dengan sebagian inti sel warna biru ; D. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0,005 mgml⁻¹, ekspresi protein ICAM-1 berkurang lebih banyak dengan inti sel banyak berwarna biru ; E. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0,01 mgml⁻¹, ekspresi protein ICAM-1 semakin berkurang dengan lebih banyak inti sel banyak berwarna biru. Panah biru = positif ICAM-1, panah merah = negatif ICAM-1.

Tabel 3. Efek Pemberian Ekstrak teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Terhadap Ekspresi Protein

Kelompok Perlakuan	Jumlah Sel	Ekspresi Protein ICAM-1 (X \pm SD)%
Kontrol negatif	147	0.00 \pm 0.00 ^a
Kontrol positif	267	96.17 \pm 12.39 ^b
TM1 (0.001 mgml ⁻¹)	220	7.32 \pm 13.53 ^a
TM2 (0.005 mgml ⁻¹)	267	1.97 \pm 5.46 ^a
TM3 (0.01 mgml ⁻¹)	239	0.71 \pm 3.19 ^a

ICAM-1
Keterangan: Data berdasarkan analisis statistik Duncan (p<0.01), perbedaan notasi huruf menunjukkan terdapat perbedaan nyata.

Berdasarkan analisis statistik One Way Anova yang dilanjutkan dengan uji "beda kelompok" Duncan, jumlah ekspresi protein ICAM-1 menunjukkan terdapat perbedaan nyata (p<0.01) pada kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif. Pemberian ekstrak teh Rosella Merah pada berbagai dosis yaitu 0,001 mgml⁻¹, 0,005 mgml⁻¹ dan 0,01 mgml⁻¹ berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif yang tidak diberikan ekstrak teh Rosella merah, namun

antar dosis ekstrak teh Rosella Merah yaitu dosis 0,001 mgml⁻¹, 0,005 mgml⁻¹ dan 0,01 mgml⁻¹ tidak menunjukkan beda nyata.

Hubungan antar perlakuan pemberian berbagai dosis ekstrak teh Rosella Merah terhadap jumlah ekspresi protein ICAM-1 dilihat dengan menggunakan uji statistik korelasi non parametrik menggunakan Spearman's ($p < 0,01$). Dari hasil analisis tersebut diketahui bahwa terdapat hubungan negatif antara jumlah ekspresi protein ICAM-1 pada kelompok kontrol positif dengan jumlah ekspresi protein ICAM-1 pada kelompok yang diberikan ekstrak teh dengan berbagai dosis dengan koefisien korelasi adalah -1. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar pemberian dosis ekstrak teh pada sel endotel yang telah dipapar Ox-LDL semakin kecil jumlah ekspresi protein ICAM-1.

Pada penelitian ini membuktikan bahwa dengan pemberian Ox-LDL dengan konsentrasi 40 μ gml⁻¹ pada sel endotel vena umbilikalis manusia (HUVECs) dapat meningkatkan aktivasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α dan ekspresi protein ICAM-1 secara bermakna dibandingkan dengan tanpa pemberian Ox-LDL. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Robbesyn *et al* (2003) [9] yang dilakukan secara *in vitro* bahwa pemberian Ox-LDL pada HUVECs dapat menyebabkan terjadinya aktivasi NF- κ B. Dijelaskan pula bahwa Ox-LDL sebagai stres oksidatif akan menyebabkan peningkatan pembentukan ROS secara intrasel yang mengakibatkan teraktifasinya proteasome dan selanjutnya terjadi degradasi I κ B dan terjadi aktivasi NF- κ B. Guzik *et al* (2003) [10] menjelaskan bahwa jalur signal untuk kerusakan endotel melalui ox-LDL antara lain melalui ROS yang dibentuk intraseluler dan aktivasi protein kinase dan faktor transkripsi NF- κ B.

Cominacini *et al* (2000) [11] menunjukkan bahwa adanya Ox-LDL akan meningkatkan ikatan ox-LDL pada reseptor endotel LOX-1 yang mengawali aktivasi NF- κ B dan terjadi juga peningkatan pembentukan ROS. Bukti lain ditunjukkan oleh Calara *et al* (2000) [7] bahwa pemberian ox-LDL pada kultur sel endotel manusia (HUVECs) menyebabkan timbulnya stres oksidatif yang berakibat pada pembentuk radikal bebas superoksida dan selanjutnya mengaktifasi NF- κ B. LDL yang termodifikasi oleh lipoxigenase juga dapat mengaktifasi NF- κ B melalui jalur aktivasi CAMP dan *protein kinase A* (PKA). Menurut Brand *et al* (1996) [12], teraktifasinya NF- κ B merangsang gen inflamatori dan proliferasi sel dalam sel endotel.

Dalam penelitian, pemberian Ox-LDL juga meningkatkan ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1 secara bermakna. Menurut Collins *et al* (2001) [3], teraktifasinya NF- κ B merangsang banyak sekali gen antara lain molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1, P selectin), molekul sitokin proinflamatori /kemokin (IL-1, IL-2, IL-6, IL-9, TNF- α , MCP, *C-reactive protein*, *tissue faktor-1*, *Urokinase type Plasminogen aktifator*, COX-2, iNOS, molekul yang terlibat apoptosis (*Fas-ligand*, Bcl-xL), *growth factor* (GCSF, PDGF B, trombospondin) dan masih sangat banyak lagi gen yg menjadi sasaran aktivasi dari NF- κ B. Penelitian lain secara *in vitro* membuktikan bahwa pemberian Ox-LDL pada HUVECs meningkatkan produksi TNF- α dan IL-1 melalui aktivasi NF- κ B [12], dimana TNF- α akan meningkatkan proliferasi sel otot polos pada pembuluh darah dan menyebabkan inflamasi [3].

Efek Ekstrak Teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Terhadap Aktivasi NF- κ B

Pengukuran aktivasi NF- κ B dan analisis ANOVA, didapatkan bahwa terdapat pengaruh pemberian ekstrak teh Rosella merah terhadap penghambatan aktivasi NF- κ B secara bermakna. Jumlah aktivasi NF- κ B pada kelompok kontrol positif (dipapar Ox-LDL) lebih tinggi signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa ox-LDL akan menyebabkan meningkatnya *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang mengakibatkan teraktifasinya NF- κ B. Apabila dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak teh rosella merah, jumlah aktivasi NF- κ B kelompok kontrol positif lebih tinggi secara signifikan. Penelitian ini mendukung penelitian Tseng *et al* (1996) [13] bahwa ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) mempunyai aktifitas antioksidan. Diduga zat bioaktif yang mempunyai aktifitas antioksidan dan berperan dalam menghambat aktivasi NF- κ B adalah senyawa polifenol terutama protocatechuic acid dan flavonoid-antosianin selain vitamin C yang terkandung dalam Rosella merah [14,15]. Dijelaskan pula bahwa protocatechuic acid (PCA) dapat mencegah terlepasnya ikatan p50 dan p65 (bagian dari NF- κ B) sehingga tidak terjadi translokasi p50/p65 ke dalam nukleus dan sebagai inhibitor NADPH oxidase yang menghasilkan radikal superoksida anion.

Ho (2002) [16] dikemukakan bahwa efek penghambatan antioksidan pada aktivasi NF- κ B telah dibuktikan melalui penghambatan degradasi I κ B, penghambatan aktivasi enzim

kinase I κ B sehingga tidak terjadi fosforilasi akibatnya dimer NF- κ B (p50 dan p65) tidak terlepas dan selanjutnya tidak terjadi translokasi p50 dan p65 ke dalam nukleus. Dijelaskan juga bahwa efek penghambatan antioksidan terhadap aktivasi NF- κ B melalui penghambatan ikatan pada gen target (*DNA binding domain*). Hal ini diperkuat oleh Stache *et. al* (2002) [17] bahwa PCA terbukti mempunyai kemampuan dalam menghambat aktivasi NF- κ B melalui penghambatan degradasi I κ B alpha pada HUVECs. Lee *et. al* (2002) [18] menjelaskan bahwa aktifitas antioksidan yang dimiliki PCA dalam menghambat oksidasi LDL lebih tinggi dibandingkan vitamin C melalui penghambatan degradasi kolesterol dan fragmentasi apo B.

Sedangkan menurut Jonadet *et. al* (1990) [19], kandungan antosianin dan flavon dalam ekstrak kasar *calyces* Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn) secara hidroalkoholik pada *in vivo* terbukti sebagai angio protektif. Penelitian lain membuktikan bahwa antosianin dalam ekstrak kering kelopak Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn) mampu menghambat stress oksidatif [20]. Hal ini dipertegas oleh Ranzio (2002) [15] dan Mazza & Miniati (1993) [21] antosianin dan flavon telah terbukti dapat menghambat LDL oksidasi dan menghambat aktivasi NF- κ B serta menurunkan inflamasi.

Berdasarkan analisis beda nyata menggunakan Duncan, ternyata antar berbagai dosis pemberian ekstrak teh Rosella Merah (dosis 0.01 mgml⁻¹, 0.005 mgml⁻¹, 0.001 mgml⁻¹ tidak menunjukkan beda nyata. Hal ini dimungkinkan oleh jarak (*range*) yang diberikan terlalu dekat dan dosis yang terlalu kecil. Dari hasil analisis korelasi Spearman's didapatkan korelasi negatif dan bermakna antara aktivasi NF- κ B dengan pemberian ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn). Hal ini berarti semakin tinggi dosis pemberian ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn), aktivasi NF- κ B semakin berkurang. Hal ini disebabkan oleh adanya efek penghambatan dari ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap aktivasi NF- κ B akibat induksi Ox-LDL.

Efek Penghambatan Teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Terhadap Peningkatan Ekspresi Protein TNF- α

Berdasarkan pengukuran ekspresi protein TNF- α dan analisis Anova didapatkan bahwa pemberian ekstrak teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dapat menurunkan ekspresi protein TNF- α secara signifikan dibandingkan pada kelompok kontrol positif. Hal ini disebabkan

oleh aktifitas antioksidan yang dimiliki oleh teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn). Duke (2004) menjelaskan bahwa beberapa zat bioaktif dalam *Hibiscus sabdariffa* yaitu senyawa penolik (*protocatechuic acid* dan flavonoid-antosianin) dan vitamin C mempunyai aktifitas antioksidan dan mempunyai aktifitas anti inflamasi [22].

Mekanisme penghambatan ekstrak teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap ekspresi protein TNF- α pada HUVECs adalah melalui penghambatan aktivasi NF- κ B dengan penghambatan degradasi I κ B, penghambatan aktivasi enzim kinase I κ B sehingga tidak terjadi fosforilasi akibatnya dimer NF- κ B (p50 dan p65) tidak terlepas dan selanjutnya tidak terjadi translokasi p50 dan p65 ke dalam nukleus [17]. NF- κ B merupakan suatu faktor transkripsi yang berperan penting dalam pengaturan berbagai gen termasuk respon inflamasi dan proliferasi. NF- κ B berperan dalam regulator ekspresi protein/gen inflamasi dengan menginduksi transkripsi protein atau gen-gen proinflamatori akibat adanya stimuli seluler seperti signal-signal oleh adanya patogen atau stress misalnya Ox-LDL. Protein atau gen yang aktif ditranskripsi dapat terjadi pada daerah endotel, otot polos, makrofag.

Efek Penghambatan Teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Terhadap Peningkatan Ekspresi Protein ICAM-1

Berdasarkan pengukuran ekspresi protein ICAM-1 dan analisis ANOVA didapatkan bahwa terdapat pengaruh pemberian ekstrak teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) pada ekspresi protein ICAM-1. Pemberian ekstrak teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dapat menurunkan ekspresi protein ICAM-1 secara signifikan dibandingkan pada kelompok kontrol positif. Hal ini disebabkan oleh aktifitas antioksidan yang dimiliki teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn). Disamping antioksidan mengurangi toksisitas Ox-LDL pada sel endotel, diduga efek penghambatannya terletak pada kemampuan zat bioaktif dari teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terutama senyawa penolik (*protocatechuic acid* dan flavonoid-antosianin) dalam menghambat aktivasi NF- κ B dengan penghambatan degradasi I κ B, penghambatan aktivasi enzim kinase I κ B.

Tidak terdapat beda nyata antar berbagai dosis pemberian ekstrak teh Rosella Merah (dosis 0.01 mgml⁻¹, 0.005 mgml⁻¹, 0.001 mgml⁻¹ yang dimungkinkan oleh jarak (*range*) yang diberikan terlalu dekat dan dosis yang terlalu kecil. Adanya hubungan negatif antara ekspresi protein ICAM-1

dengan pemberian ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) disebabkan oleh adanya efek penghambatan dari ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap ekspresi protein ICAM-1 akibat induksi Ox-LDL.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Pemberian LDL teroksidasi pada HUVECs mampu meningkatkan aktivasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1 yang memediasi terjadinya aterosklerosis. Pemberian ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) berbagai dosis (0.001 mg/ml, 0.005 mg/ml, 0.01 mg/ml) pada (HUVECs) yang selanjutnya dipapar LDL teroksidasi dapat menghambat aktivasi NF- κ B, menghambat peningkatan ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1 yang memediasi terjadinya aterosklerosis. Efek penghambatan dari zat bioaktif *protocatechuic acid*, antocyanin dan vitamin C dari ekstrak teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) pada penghambatan peningkatan ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1 yang memediasi terjadinya aterosklerosis pada HUVECs melalui penghambatan aktivasi NF- κ B dan dibuktikan dengan adanya korelasi negatif dengan analisis korelasi Spearman's ($p=0.00$; *correlation coeff*= -1).

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap penghambatan meningkatnya ROS (*Reactive Oxygen Species*) seperti H₂O₂ untuk membuktikan keterlibatan radikal bebas pada aterosklerosis. Diperlukan penelitian lanjut dengan metode pengukuran yang bersifat kuantitatif dan lebih akurat menggunakan analisis *Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)* dan perlu penelitian lanjut dengan ekstrak murni zat bioaktifnya, sehingga data lebih akurat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tjokprawiro, A. 1997. *Diabetes Up Date 1997 Dalam : Proceedings Of The Third Surabaya Diabetes Up Date*, Surabaya, p 1-21
2. Ross, Russell. 1999. *Atherosclerosis-An Inflammatory Disease*. N. Eng J Med, Volume 340, p 115-126
3. Collins, Tucker., Cybulsky, Myron I. 2001. *NF-KB : Pitaval Mediator Or Innocent Bystander In Atherogenesis ?*. The Journal Of Clinical Investigation, Volume 107, Number 3, P. 255-263.
4. Krause, Brian R., et.al. 2002. *Direct Vascular Target For Atherosclerosis Prevention*. Departement Of

- Cardiovascular Therapeutic, Pfizer Global Research And Development, USA
5. Chang-che chew, et al. 2003. *Hibiscus Sabdariffa Extract Inhibits The Development Atherosclerosis In Cholesterol-Fed Rabbit*. Journal Of Agricultural And Food Chemistry.
6. Lopez, Resendiz., et all.2003. *Antimutagenicity Of Natural Phenolic Compounds In Dried Flowers From Hibiscus Sabdariffa Linn*.
7. Calara, Federico. 2000. *An Animal Model To Study Local Oxidation Of LDL And Its Biological Effect In The Arterial Wall*. Arteriosclerosis, Thrombosis And Vascular Biology, Volume 18, p 884-893
8. Arjita et al.2002. *Pengaruh Kadar Glukosa Tinggi Terhadap Sintesa Nitrix Oxide Dari Huvecs Culture Dengan Teknik Bioassay*. Biosain, Volume 2 No 1 April
9. Robbesyn F, Garcia V, Auge N, Vieira O, Frisach MF, Salvayre R, Negre-Salvayre A. 2003. HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappaB activation in smooth muscle cells. *FASEB J*. 2003 Apr;17(6):743-5. Epub 2003 Feb 5.
10. Guzik, TJ., & Korbut R., & Guzik, T. Adamek .2003. *Nitric Oxide And Superoxide In Inflammation And Immun System Regulation*. Juornal Of Physiology And Pharmacology, Volume 54, No 4, p 469-487
11. Cominacini, Luciano., et.all. 2000. *Oxidied Low Density Lipoprotein (Ox-LDL) Binding To Ox-Ldl Receptor-1 In Endothelial Cells Induces The Activation Of NF-KB Through An Increased Production Of Intracelluler Reactive Oxigen Species*. The Journal Of Biological Chemistry, Volume 275, no 17, p 12633-12638
12. Brand, Korbinian., et. all. 1996. *Activated Transcription Factor Nuclear Factor Kappa Beta Is Present In Atherosclerotic Lesion*. J. Clinical Investigation, Volume 97, Number 7, P 1715-1722.
13. Tseng, T.H., et al. 1996. *Hibiscus Protocatechuic Acid Protecct Against Oxidative Damage Induced By Tert. Butylhydroperoxide In Rat Primary Hepatocytes*. Chem Biol Interact., August 14;101(2); p.p.137-148
14. Jamie , et al. 2000. *Hypothesis : A Central Role For The Endothelial NADPH Oxidase In Atherosclerosis* .FEBS, Pubmed, volume 472, Issue 1,p.p 1-4
15. Ranzio B, 2002. *Anti Inflammatory Activities Of Polyphenol-Review : Polyphenol As Anti Inflammatory Agents*. Journal Of Naturopathic Medicine,Volume 9, p.44-50
16. Ho, E. 2002. *The Virtual Free Radical School : NF-KB- What Is It And What'S The Deal With Radicals?*. Linus Pauling Institute Scintist, Departement Of Nutrition & Food Management, Oregon State University.
17. Stache et al.,2002. *Inhibition Of TNF-Alpha Induced Cell Death In Human Umbilical Vein Endothelial Cells And Jurkat Cell By Protocatechuic Acid*. NCBI, Med. Biol. Eng. Comput, 40(6), p 689-703

18. Lee Mj , et al. 2002. *Hibiscus Protocatechuic Acid Or Esculetin Can Inhibit Oxidative LDL Induced By Either Copper Ion Or Nitric Oxide Donor*. Journal Agriculture Food Chemical, Maret 27;50(7);p.p. 2130-2136
19. Jonadet, M, et al. 1990. *In Vitro Enzyme Inhibitory And In Vivo Cardioprotective Activities Of Hibiscus (Hibiscus Sabdariffa Linn)*.Journal Pharmacology .Belg, Maret-april;45 (2); p.p.120-124
20. Ali, BH., Mousa HM., El Mougys.2003. *The Effect Of Water Extract And Anthocyanins Of Hibiscus Sabdariffa Linn On Paracetamol-Induced Hepatotoxicity In Rats*.
21. Mazza G, Miniati E. 1993. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*. 1st ed. Fla:CRC Press. Florida.
22. Duke, James A. 2004. *Phytochemical Database, USDA-ARS,NGRL*. Agricultural Research Service, Beltsvile Research Center, Maryland